

A projekt fő célkitűzéseit mind a négy évre vonatkozóan, lényegében a munkatervnek megfelelően teljesítettük. Természetesen az utolsó év kutatásai még nem kerülhettek közlésre, ezért ezekről részletesebben számolok be.

Élesztőn (*Saccharomyces cerevisiae*, *S. cerevisiae*) végzett modell kísérletekben, hexóz transzportban és foszforilációban deficiens törzseken bizonyítottuk, hogy a glükóz ill. galaktóz által kiváltott citoszól Ca-tranziens (TECC = Transient Elevation of Cytosolic Calcium) függ a glükóz ill. galaktóz érzékelésétől, sejtbe történő felvételétől és foszforilációjától (Mol Microbiol. 2002 44(5):1299-308.). Röviden, a hexóz transzportban és foszforilációban deficiens törzseket többszörös célzott gendelációval állítottuk elő, ill. egy részük dr. Dane Fraenkel (Harward), valamint dr. Eckhardt Boles (Dusseldorf) ajándéka volt. A sejtekbe az apoaequorin gént kódoló plazmidot klónoztunk, ami lehetővé tette, hogy in vivo mérjük a citoszól plazmakalcium szinteket. Általában az alap kalcium szint mérése után glükózt, vagy galaktózt adtunk a sejtszuspenzióhoz, majd mértük a citoszól kalcium szint változásait.

Ugyancsak sikerült bizonyítanunk azt, hogy a TECC elsősorban az extracelluláris tér kalcium tartalmától függ, mivel ennek csökkentése kalcium kelátorokkal jelentősen redukálta a TECC választ is. Sikerült igazolni azt, hogy az emlős plazmamembrán kalcium csatorna homológ összetevő MID1 gén által kódolt fehérje lényeges szerepet játszik a kalcium beáramlás folyamatában. Ugyancsak valószínűsítettük, hogy a TECC létrejöttében –egyelőre nem ismert módon- a glükóz-1-P játszik szerepet.

Felfedeztük, hogy egy a glükóz foszforilációjára képtelen mutáns sejtvonalt, amely azonban galaktózon növekedni képes, jelentős mennyiségű molekuláris glükózt akkumulál. Ez a jelenség –mivel a nem foszforilált glükóz a sejtéből kiszabadul-, önmagában jelezte, hogy kompartmentalizált glükóz felszaporodásáról van szó (Eukaryot Cell. 2003 2(3):534-41.). Erre utalt az is, hogy a sejtekben generált és felszaporodott glükóz a kívülről bevitt ¹⁴C-glükózzal nem, vagy csak csekély mértékben keveredett. A folyamat hátterében megállapítottuk azt, hogy jelenség az aszparaginhez kapcsolt glükozilációhoz köthető. Ebben a folyamatban az ergasztoplazmás retikulumban a mag oligoszacharid a fehérjék megfelelő aszparagin összetevőjére kerül át, majd 3 glükóz és 1 mannóz molekula glükozidázok hatására leválik. Mivel mind a mag oligoszacharida szintézisének a gátlása (tunicamycin), mind pedig a glükóz hasítást végző glükozidázok gátlása (castanospermine, 1-deoxynojirimycine) vagy gendelációja (ALG5, ALG6) szignifikánsan csökkentette a galaktóz-glükóz konverziót, arra a

következtetésre jutottunk, hogy mintegy az összes galaktóz 0.9 - 1.1%-a ezen az úton konvertálódik glükózzá, ami azután a szekretoros elemekben tárolódik, majd a környezetbe jut.

Ugyancsak megállapítottuk, hogy a szekretoros rendszerben felhalmozódott magas koncentrációjú glükóz erősen károsítja azt: nem enzimatis glikáció okán (a szabad lizin amino csoportok Amadori reakciója a glükózzal) kialakult, erősen emelkedett fruktózamin szinteket mértünk. Ugyanez a jelenség játszódik le a magas glükóz szintnek kitett diabéteszes szövetekben.

Jurkat sejteken (tenyésztethető humán T limfociták) azt találtuk, hogy emelkedő környezeti glükóz szintek hatására emelkedik a bazális kalcium szint (Immunol Lett. 2002 3;82(1-2):159-64.). Csökken viszont a fiziológiás stimulusokra adott válaszképesség. A sejt kultúrákat eltérő koncentrációjú glükóz jelenlétében inkubáltuk, majd anti-CD3 monoklonális ellenanyaggal stimuláltuk. A kalcium mérésekhez ezúttal FLUO-3-al töltött sejteket használtunk, s a mérést áramlásos citometriával végeztük. A magas koncentrációjú glükózzal kezelt sejtekéhez hasonló választ értünk el akkor is, ha a kalcineurint, -amely a kalcium ionokhoz kötött jelátvitel fontos közvetítője- bénítottuk ciklosporin-A-val. A jelenség hátterében a Ca^{2+} kompartmentalizáció és Ca^{2+} kötött jelátvitel fehérjéinek a glikációs módosulását és aktivitáscsökkenését valószínűsítettük.

Sikerült előrelépünk abban a tekintetben, hogy a hexóz-foszfátok felszaporodása milyen következményekkel jár a Ca^{2+} közvetített jelátvitelre és a Ca^{2+} homeosztázisra. Ennek a kutatási vonalnak a keretében felfedeztük, hogy a Ca^{2+} homeosztázis korábban általunk leírt súlyos rendellenességét, ami a glükóz-1-P és a glükóz -6-P interkonverzióját katalizáló foszfoglukomutáz (PGM) enzim csökkent funkciója okoz (J Biol Chem. 2000 275(8):5431-40.) kompenzálni lehet azzal, ha a foszfofruktokináz (PFK) enzim aktivitását is csökkentjük, s ez a két cukorfoszfát közötti egyensúly helyreállítását eredményezi (J Biol Chem. 2002 277(48):45751-8.). Megjegyzendő, hogy a PFK2 géndelációja (a PFK2 az enzim szabályozó alegységét kódolja, s delációja ismertén a glükóz-6-P felszaporodásához vezet) a PGM2-es mutánsban egy magasabb szinten stabilizálódott egyensúlyi állapotot hoz létre: azaz a glükóz 1-P és a glükóz-6-P szintjei is magasak, de a hányadosuk hasonló az élesztőben normálisan láthatóhoz. Ugyancsak felfedeztük, hogy glükóz-1-P relatív megemelkedése miatti fokozott Ca^{2+} akkumuláció és jelátviteli zavarok nem a plazma membrán megnövekedett Ca^{2+} áteresztőképessége, hanem a lizoszómáknak megfelelő vakuólumok membránjában

elhelyezkedő PMC1 Ca²⁺ -ATPáz fokozott teljesítménye révén valósul meg (J Biol Chem. 2004 279(37):38495-502.). Nem tudjuk azt, hogy a glükóz-1-P miként fejti ki a hatását, mert izolált membránokban glükóz-1-P nem stimulálta a Ca²⁺ felvételét. Érdekes észleletünk volt azonban az, hogy az ER-kapcsolt "unfolded protein response" erősen fokozódott a csökkent PGM aktivitással bíró törzsben. Ezt a jelenséget az ER csökkent kalcium szintjének tudtuk be, ami a sejten belüli kalcium kompartmentalizációs zavarra vezethető vissza.

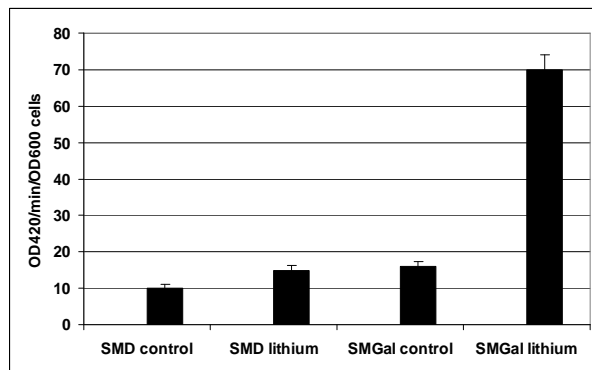
Időközben részletes irodalmi kutatást végeztünk abban a tekintetben, hogy a PGM mutációi, polimorfizmusai járnak-e valamilyen kóros fenotípussal. Érdekes módon ebben a vonatkozásban csak sporadikus közlemények vannak, ugyanakkor ismert az, hogy a PGM hatékonyan gátolható lítium ionokkal. A gátlás mechanizmusa is érdekes: a PGM magnéziumot igényel a működéséhez, amit a lítium leszorít (hasonló hidratált átmérők), a Li-PGM komplex pedig két nagyságrenddel kisebb aktivitással rendelkezik mint a Mg-PGM. Ezért vizsgálatokat indítottunk annak a kiderítésére, hogy a lítium előidéz-e azokat a változásokat, melyeket a PGM deficiens mutánsokban láttunk..?

Eredményeink azt igazolták, hogy hasonlóan a deléciós mutánsokéhoz, a lítium is aktivitáscsökkenést okoz, s kialakulnak a megfelelő fenotípusok. Így, galaktózon a sejtek növekedése lítium jelenlétében, a koncentrációtól függően lassul. (A sejtek nem mutatnak növekedésgátlást glükóz jelenlétében.) Galaktózon erősen emelkedik a sejt glükóz-1-P és kalcium tartalma. Az utóbbi jelenséget a PFK2 alegység vagy a PMC1 Ca-ATP-áz deléciói kompenzálják.

Ugyancsak jelentősnek tartott, nem közölt eredményünk az, hogy az "unfolded protein response" igen erősen emelkedik a lítiummal kezelt sejtekben (1. ábra). A kísérletet UPR elemeket tartalmazó "riporter" plazmiddal végeztük, melyet a vad típusú és *pgm2Δ* mutáns sejtvonalakba klónoztunk. Az UPR elemek aktiválódása a β -galaktozidáz gén aktiválódását eredményezi, ami közvetlenül mérhető, ha a β -galaktozidáz enzim aktivitását meghatározzuk. A keletkezett kromogént 420nm-en fotometráljuk és az abszorbancia változását 1 percre vonatkoztatjuk. A sejtszámot 600nm-en mérjük.

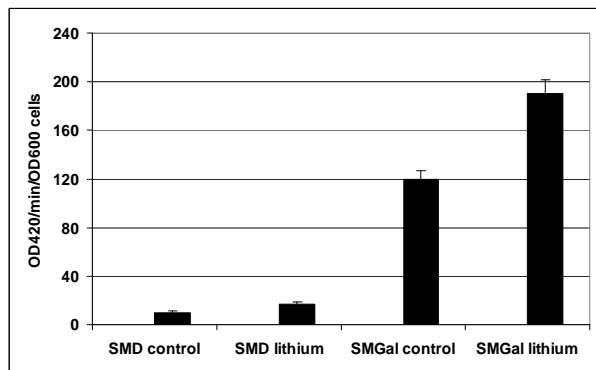
1. ábra

A.



vad típus

B.



pgm2Δ mutáns

Minta az az ábrából kitűnik, a 15 mmol/l lítium csak csekély mértékű növekedést idéz elő az UPR-ban akkor, ha a sejteket glükóz jelenlétében inkubáltuk. Ugyanakkor galaktózon igen jelentős a Li⁺ indukálta emelkedés. Mivel a *pgm2Δ* mutáns eleve csökkent PGM aktivitással bír, Li⁺ hiányában is erősen fokozott az UPR válasz, ezt azonban a Li⁺ még tovább erősíti.

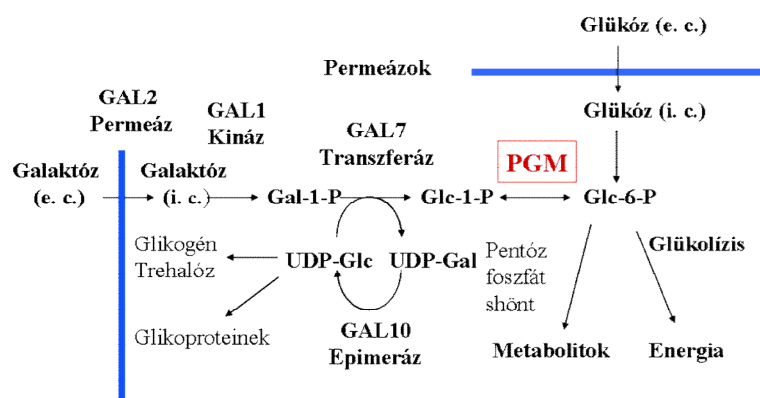
Ez a megfigyelésünk valószínűsíti azt, hogy a Li⁺ az ergasztoplazmás retikulum kalcium szintjének a csökkentésén keresztül jelentősen megváltoztatja a fehérjék aszparaginhez kötött glikálódását. Következő célunk ennek a jelenségnek a vizsgálata emlős sejteken.

Az elmúlt évben előzetes kutatásokat végeztünk abban a tekintetben, hogy milyen mértékben gátolt a PGM a szokásos terápiás Li⁺ szint (0,6-1,4 mmol/l) mellett. Eredményeink szerint az agy relatív alacsony Mg²⁺ tartalma miatt itt a Li⁺ inhibíció kifejezettebb lehet (Int J Neuropsychopharmacol. 2005 Nov 1;:1-7 [Epub ahead of print]). Ugyancsak megállapítottuk, hogy a krónikus Li⁺ kezelés jelentős PGM aktivitás változásokat eredményez amelyek valószínűleg a PGM1 gén indukciója miatt következnek be.

A 2005-évi kutatási tervrészletben szerepel a kalcium influx faktor (CIF) mibenlétének a kiderítése. Ehhez célzott gendelécíós mutációkat végeztünk a Leloir bioszintetikus ösvény különböző enzimein: GAL1, GAL2, GAL7 és GAL10 delécíós mutánsok. A metabolikus blokk közvetlen helyétől függően szaporodnak fel a blokk előtti és csökkennek le a blokk mögötti termékek. A CIF biológiai tesztelését albínó béka petesejteken végezzük el dr.

2. ábra

A glükóz és galaktóz metabolizmus sémás ábrázolása Victoria Bolotina



laboratóriumával közösen.

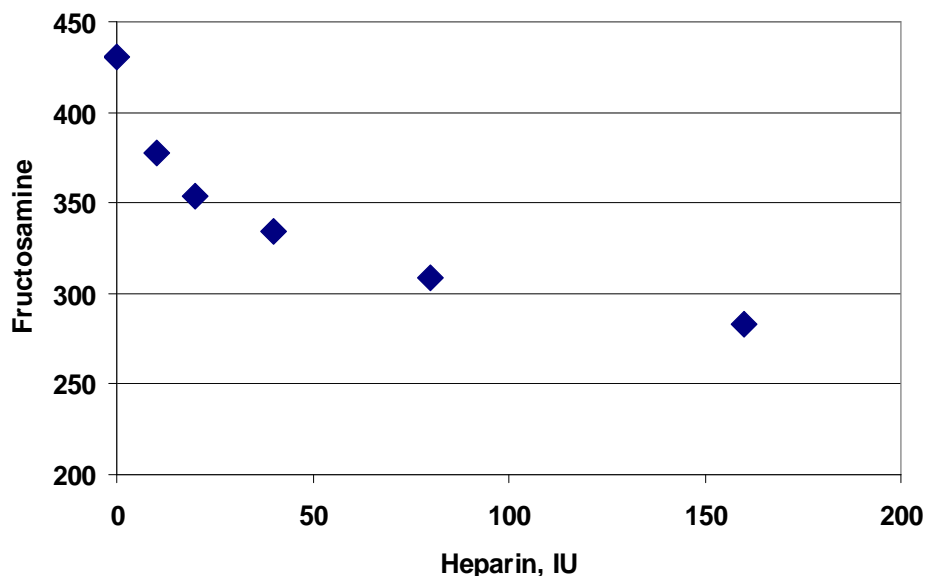
Ezek a vizsgálatok jelenleg még folyamatban vannak.

Egyéb, a projekt szempontjából releváns vizsgálatok: laboratóriumunkban és világszerte egy hemoglobin (Hb) variáns az un. HbA1C

mérése a legelfogadottabb diabéteszes marker. Ez a Hb variáns a glükóz és a Hb β -lánc terminális aminocsoportjának a spontán reakciójában keletkezik folyamatosan. Nem ismert, hogy kórjelző szerepén kívül más jelentősége lenne, valószínűleg azért, mert a vörösvértestek életideje csak 120 nap, s e keletkező kóros módosulat ennyi idő alatt nem szaporodik fel annyira, hogy funkcionális vagy struktúrális defektusokat okozzon a vörösvérsejtekben. A HbA1C mellett a fruktózamin elsősorban az albumin glikálódását jelzi, a 20 napos életidő miatt azonban ez rövidebb időszak megítélésére alkalmas diabéteszes marker. A glikálódás mértéke azonban eltérő a hasonló diabéteszes kórtörténetű betegekben. Annak a megítélése, hogy ez a terápia eltérő hatékonyságát jelzi-e nem egyértelmű. A glikálódás szövődményeinek a visszaszorítására szokás a szabad aminocsoportokkal reagáló szereket adni.

Ugyanakkor ismert, hogy a heparin a hatását éppen az antitrombin-III egyik szabad lizinjéhez kapcsolódva fejt ki. Az is ismert, hogy számos szerv tartalmaz heparint, ezen endogén heparin funkciója azonban kevésbé ismert. Kísérleteinkben vizsgáltuk, hogy a heparin miként befolyásolja a fruktózamin és HbA1C kialakulását. Előzetes eredményünket mely egy natív szérumon végzett kísérlet először ezen a helyen mutatjuk be (3. ábra).

3. ábra



Eredményeink szerint a 37 oC-on inkubált és 20mmol/l glükózt tartalmazó szérum glikálódását a heparin már viszonylag kis koncentrációban is gátolta 72h inkubálás után!

Összefoglalva: a témavezető úgy érzi, hogy a jelen OTKA és egyéb pályázatok támogatásával –természetesen a pályázat szerény összege nem tette lehetővé a teljes szponzorálást-, jelentős mértékben megfeleltünk a munkatervünkben leírtaknak. Vezető nemzetközi lapokban sikerrel publikáltunk mindegyik pályázati évben. Eredményeinkről elsősorban hazai, de néhány nemzetközi tudományos konferencián is beszámoltunk. A téma anyagát részben felhasználva PhD védés is született, ill. egy második folyamatban van. 2004-ben a témavezető elnyerte az MTA Doktora címet. Védésében -kis részben ugyan- de bemutatta a jelen anyagokat is. Ugyancsak lényegesnek tartjuk, hogy a kísérletek újabb érdekes kérdéseket vetettek fel, melyek továbbvizsgálatra érdemesek.

Befejezésül köszönjük az Orszgos Tudományos Alap támogatását!